

A projekt célja a de- és remyelinisatio poszttranszkripció szabályozásának vizsgálata volt. Erre a cuprizon (CPZ) modellt alkalmaztuk, mely a corpus callosumban okoz demyelinist, majd a CPZ felfüggesztését követően spontán remyelinist. 1-2-3-4-5-6 hétig adaholtuk a CPZ-t csoportonként 7 egerrel: ily módon indukáltunk kísérletes demyelinist. Minden csoporthoz 5 további egeret alkalmaztunk kontrollként. Minden egyes demyelinist csoporthoz két remyelinist csoporthoz is felállítottunk a korai és késői remyelinisatio vizsgálatára: az 1-2-3-4-5-6 hetes demyelinisatio indukció után minden csoportban 2 napig vagy 2 hétig az állat normál tápot kapott, ezzel a spontán beinduló remyelinist kívántuk vizsgálni korai akut, és késői krónikus fázisban. A két remyelinist csoporthoz mind a hat időpontban 7 egerből állt, valamennyi csoporthoz szintén 5 kontroll egeret alkalmaztunk. A terminálást követően fagyasztásra került a teljes agy, valamint izom, vese, máj, thymus és lép.

A corpus callosumot mikroszkóp alatt eltávolítottuk a fagyasztott teljes agyból. RNS-t izoláltunk, majd a 4 hetes CPZ csoportban a demyelinist és a korai és késői remyelinist mintákból elvégeztük a miRNS array-t. Az array alapján 3 miRNS-t azonosítottunk, melyek időben differenciáltan expresszáldtak, és a kontroll mintától is különböztek. Az egyik miRNS humán homológja schizophren betegek temporalis kérgében mutat változást, glioblastomában down-regulálddik, és tumor szuppresszorként funkcionálhat. Egy másik miRNS gyulladással asszociálddik experimentális és humán temporalis lebeny epilepsziában, és a mikroglia aktivációval függhet potenciáldisan össze. A harmadik miRNS funkciójára vonatkozóan gyakorlatilag nincsenek adatok.

Ezt követően beállítottuk a 3 miRNS validáldására a real-time PCR-t, majd a 4 hetes minták validáldását követően a többi időpontban és mintában is elvégeztük a 3 miRNS expresszió vizsgáldatát. Az eredmények azt jelzik, hogy már az egy hetes demyelinist követően csökken mindhárom miRNS expressziója, majd a 2 hetes remyelinisatio során tér vissza a kontrollnak megfelelő expressziós szintre; valamennyi időpontban vett mintában ugyanezen expressziós profil észlelhető.

Majd a következő lépésben megvizsgáldtuk, hogyan változik a 3 miRNS expressziója az ontogenetikus myelinisatio során. A cél a mikroarray alapján cuprizonnal indukált de- és remyelinisatio során változást mutató mikroRNS-ek visszamérése volt a fiziológiás myelinisatio során. Postnatalis 1 napos, 3 napos, 5 napos, 7 napos, 10 napos és 14 napos egerek agyából izoláltuk a corpus callosumot, és vizsgáldtuk a 3 miRNS expresszióját. Az egyik, kóros demyelinist követő remyelinisatio során emelkedést mutató miRNS (a fiziológiás myelinisatio során is folyamatos emelkedést mutatott, jelezve, hogy a remyelinisatio és myelinisatio génexpressziós szabályozásában ez a miRNS feltehetően szerepet játszik).

Megtörtént a kontroll szervekből (vese, lép, máj, izom, thymus) is az RNS izoláldás, elvégeztük real-time PCR módszerrel a 3 miRNS expressziójának vizsgáldatát. Ez a kontroll csoport arra ad felviláldosítást, hogy az észlelt miRNS változások az idegrendszerre, azaz a de- és remyelinistóra specifikusak-e. Mindhárom miRNS az adott szervekre jellemző, és differenciált expressziót mutat, mely a cuprizon hatására nem változik, egy szervet kivéve: a thymusban a cuprizon adagolást követően az egyik miRNS differenciáltan expresszálddik. Ezért megvizsgáldtuk a thymus patológiát, és azt találdtuk, hogy cuprizon adagolás után már egy héttel a thymus szignifikáns atrofíája alakul ki. Flow cytometriás mérésszel ezért elemeztük a CD3-CD4-CD8- (DN), CD3+CD4+CD8+ (DP), és a CD3+CD4+CD8- illetve CD3+CD4-CD8+ (SP) sejtek arányát: a cuprizon kifejezetten deletáldta a DP sejteket. Immunhisztokémiát alkalmazva, a cuprizon hatását vizsgáldtuk az epiteliálds sejtekre is, és bár valamennyi sejtípus

érintettségét észleltük, a változás legkifejezettebb volt a DP sejtek vonatkozásában. Ez arra utalhat, hogy a cuprizon befolyásolja a T sejt szelekciót, mely magyarázatot adhat arra, miért nyújt védelmet a kísérletes agyvelőgyulladás (EAE) ellen. Ez irányban további kísérleteket tervezünk, hiszen az eredmények felvetik annak a lehetőségét is, hogy az észlelt miRNS a T sejt szelekcióban szerepet játszhat. Tervezzük myasthenias thymusok vizsgálatát is.

A szervek analízise mellett megvizsgáltuk a cuprizon hatását nemcsak a demyelinizált, hanem az épnek tűnő agyi fehérállományban is. A 3 miRNS a demyelinizációhoz hasonló differenciált expressziót mutatott itt is, jelezve, hogy a cuprizon molekuláris hatása itt is érvényesül, de nem következik be oligodendrocyta pusztulás. Ez arra utalhat, hogy a különböző agyi területekn az oligodendrocyták érzékenysége a szöveti stresszel, mitochondriális hatásokkal szemben különbözik. Jelenleg zajlik a kérgi területek vizsgálata.

Kigyűjtöttük öt adatbázis (MiRanda, MiRDB, MiRWalk, PICTAR, Targetscan) alapján a 3 miRNS lehetséges mRNS célpontjait, majd egységesítettük az adatbázisokat, és megvizsgáltuk, milyen potenciális target mRNS-ek szerepelnek legalább 4 adatbázisban. Az egyik miRNS vonatkozásában 43 potenciális célpont szerepelt legalább 4 adatbázisban; útvonal elemzés a p53 jelátvitel, onkogének, Wnt útvonal szerepét jelezték. Erről a miRNS-ről egyelőre adat nem áll rendelkezésre. Egy másik miRNS target útvonalainak értékelése az axon guidance-ban való részvételt sugallja.

Az adatbázis értékelés mellett egy másik módon is elindítottuk az észlelt, de- és remyelinisatioval összefüggő miRNS-ek target mRNS értékelését: a de- és remyelinisalt corpus callosumokból mRNS-t izoláltunk, majd elvégeztük a gén expressziós arrayt. Az előzetes eredmények számos gén differenciált down-regulációját jelzik a demyelinisatio fázisban, mely a 2 hetes remyelinisatiós mintákban már a kontrollhoz hasonló szintet éri el. A sejt-specifikus RNS változás a mikroglia és oligodendrocita prekursor sejtek interakcióját sugallhatja, melyet vizsgálni fogunk.

Elvégeztük a de- és remyelinisalt corpus callosumban a 3 miRNS in situ hybridizációját, ennek értékelése jelenleg zajlik.

Egy PhD hallgató jelenlegi munkája a funkcionális kísérletek elvégzése (silencing): arra a miRNS-re koncentrálunk elsősorban, melynek funkciója eddig nem ismert, és a fejlődés során a postnatalis corpus callosumban is differenciált expresszióját észleltük. A csendesítést első lépésben oligodendrocyta sejtvonalon végezzük.

Szintén zajlik az CPZ, EAE és humán agyi plakkok génexpressziós array eredményeinek összehasonlítása külföldi kollaborációban, melynek célja olyan degeneratív és gyulladásos biomarkerek azonosítása, melyeket az SM hosszú távú prognózis becslésében alkalmaznánk.

Valamennyi publikációban, mely az OTKA kísérleteken alapul, az OTKA támogatást feltüntetjük.